

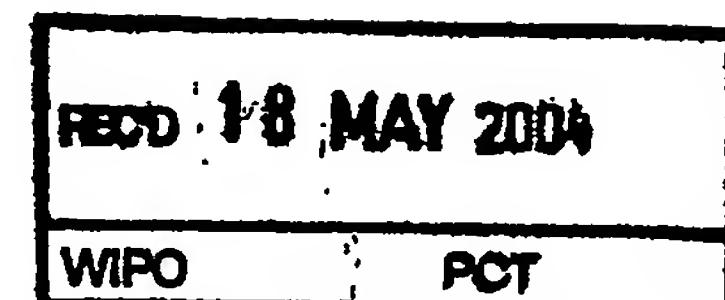


EPO4/3688

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 MAI 2004

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

COPIE EN TÉLÉCOPIE FAITE SOUS LA DÉLIVRANCE
DU 04 AVRIL 2003



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354-01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W /260899

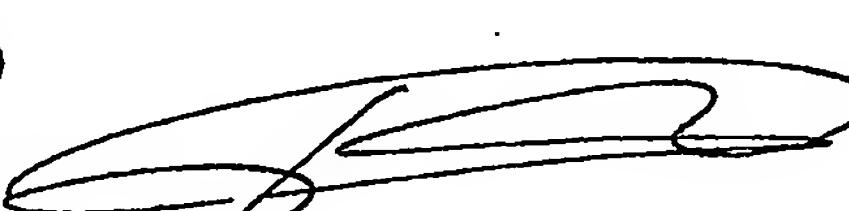
| | | | | | |
|---|----------------------|---|------------|--|--|
| REMISE DES PIÈCES DATE LIEU 99 | | Réservé à l'INPI - 4 AVR. 2003 03 04 219 | | 5) NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE SOLVAY (Société Anonyme) Direction Régionale pour la France 12, Cours Albert Ier F-75383 PARIS CEDEX 08 (France) | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI | | - 4 AVR. 2003 | | | |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) S 2003/02 | | | | | |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie | | | | | |
| 2) NATURE DE LA DEMANDE | | Cochez l'une des 4 cases suivantes | | | |
| Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> | | | | | |
| Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> | | | | | |
| Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> | | | | | |
| Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale | | N° | Date / / / | | |
| Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale | | N° | Date / / / | | |
| 3) TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé pour la fabrication de dérivés de β-aminoacides énantiopurs et dérivés de β-aminoacides énantiopurs | | | | | |
| 4) DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation Date / / / | N° | | |
| | | Pays ou organisation Date / / / | N° | | |
| | | Pays ou organisation Date / / / | N° | | |
| | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | | | |
| 5) DEMANDEUR | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | | | |
| Nom ou dénomination sociale | | SOLVAY | | | |
| Prénoms | | | | | |
| Forme juridique | | Société Anonyme | | | |
| N° SIREN | | | | | |
| Code APE-NAF | | | | | |
| Adresse | Rue | Rue du Prince Albert, 33 | | | |
| | Code postal et ville | 1050 | BRUXELLES | | |
| Pays | | Belgique | | | |
| Nationalité | | belge | | | |
| N° de téléphone (facultatif) | | | | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | | | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | | | |

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

| | |
|---|-----------------------------------|
| REMISE DES PIÈCES DATE | Réserve à l'INPI - 4 AVR. 2003 |
| LEU 99 | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | 03 04 219 |

DB 540 W /260899

| | | |
|--|----------------------|---|
| Vos références pour ce dossier : (facultatif) | | S 2003/02 |
| 6 MANDATAIRE | | |
| Nom | | |
| Prénom | | |
| Cabinet ou Société | | |
| N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| N° de téléphone (facultatif) | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | |
| 7 INVENTEUR (S) | | |
| Les inventeurs sont les demandeurs | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| Paiement échelonné de la redevance | | Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) : |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes | | |
| 10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI |
| SOLVAY (Société Anonyme) | |  |

Procédé pour la fabrication de dérivés de β-aminoacides énantiopurs et
dérivés de β-aminoacides énantiopurs

La présente invention concerne un procédé pour la fabrication de dérivés de β-aminoacides énantiopurs et des dérivés de β-aminoacides énantiopurs.

Certains β-aminoacides et leurs dérivés sont utiles dans le contexte de la fabrication de peptides utilisables comme médicaments. Des exemples 5 spécifiques de tels β-aminoacides comprennent au moins un hétérocycle azoté.

Dans la recherche de principes actifs, il est souhaitable de disposer d'aminoacides contribuant à l'activité pharmacologique notamment de peptides et utilisables dans le procédé de fabrication de peptides ou analogues de peptides.

Le brevet US 3,891,616 décrit certains peptides biologiquement actifs 10 contenant de l'acide 2-pyrrolidineacétique. Le dérivé N-Boc de cet acide est préparé par traitement de la L-proline naturelle avec du diazométhane.

Ce procédé connu requiert l'utilisation d'un aminoacide naturel énantiopur comme produit de départ. Ce dernier est soumis à des transformations avec un réactif dangereux dans des conditions susceptibles d'impliquer un risque de 15 racémisation.

L'invention vise à remédier aux problèmes mentionnés plus haut.

L'invention concerne dès lors un procédé pour la fabrication de dérivés de β-aminoacides énantiopurs répondant à la formule générale (I)

R1-NZ-CHR2-CH₂-COOR3 (I)

20 dans laquelle
R1 et R2 désignent indépendamment des résidus organiques formant éventuellement un substituant cyclique;
R3 désigne H ou un résidu organique et ;
Z représente H ou un groupement protecteur de la fonction amino, 25 comprenant une étape dans laquelle on soumet un mélange d'énantiomères d'un composé répondant à la formule générale (II)

R1-NZ-CHR2-CH₂-COOR4 (II)

dans laquelle

R1, R2 et Z sont tels que définis pour la formule (I) et ;

30 R4 est un résidu organique
à une hydrolyse en présence d'une lipase.

Il a été trouvé que le procédé selon l'invention permet de fabriquer des β -aminoacides ou leurs dérivés de pureté énantiomérique élevée avec un rendement élevé.

5 Par composé énantiopur on entend désigner un composé chiral constitué-
essentiellement d'un énantiomère. L'excès énantiomérique (ee) est défini : ee(%)
= $100(x_1-x_2)/(x_1+x_2)$ avec $x_1 > x_2$; x_1 et x_2 représentent la teneur du mélange en
énantiomère 1 ou 2 respectivement.

10 Par « résidu organique » on entend désigner en particulier des groupements alkyles ou alkylène linéaires ou branchés, pouvant comporter des hétéroatomes tels qu'en particulier des atomes de bore, de silicium, d'azote, d'oxygène et de soufre, des groupements cycloalkyle des hétérocycles et des systèmes aromatiques. Le résidu organique peut comporter des liaisons double ou triple et des groupements fonctionnels.

15 Le résidu organique comprend au moins 1 atome de carbone. Souvent il comprend au moins 2 atomes de carbone. De préférence, il comprend au moins 3 atomes de carbone. De manière plus particulièrement préférée il comprend au moins 5 atomes de carbone.

20 Le résidu organique comprend généralement au plus 100 atomes de carbone. Souvent il comprend au plus 50 atomes de carbone. De préférence, il comprend au plus 40 atomes de carbone. De manière plus particulièrement préférée il comprend au plus 30 atomes de carbone.

25 Par « groupement alkyle » on entend désigner en particulier un substituant alkyle linéaire ou branché comprenant de 1 à 20 atomes de carbone, de préférence 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 atomes de carbone. Des exemples spécifiques de tels substituants sont méthyl, éthyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, iso-butyl, tert.-butyl, n-pentyl, isopentyl, n-hexyl, 2-hexyl, n-heptyl, n-octyl et benzyl.

30 Par « groupement cycloalkyle » on entend désigner en particulier un substituant comprenant au moins un carbocycle saturé de 3 à 10 atomes de carbone, de préférence de 5, 6 ou 7 atomes de carbone. Des exemples spécifiques de tels substituants sont cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl et cycloheptyl.

35 Par « groupement alkylène » ou « groupement cycloalkylène » on entend désigner en particulier les radicaux bivalents dérivés des groupements alkyles ou cycloalkyles tels que définis ci avant.

Lorsque le résidu organique comporte une ou éventuellement plusieurs double liaisons il est souvent choisi parmi un groupement alcényl ou cycloalcényl comprenant de 2 à 20 atomes de carbone de préférence 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 atomes de carbone. Des exemples spécifiques de tels groupements 5 sont vinyl, 1-allyl, 2-allyl, n-but-2-enyl, isobutetyl, 1,3-butadiényl, cyclopentenyl, cyclohexenyl et styryl.

Lorsque le résidu organique comporte une ou éventuellement plusieurs triple liaisons il est souvent choisi parmi un groupement alkinyl comprenant de 2 à 20 atomes de carbone de préférence de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 atomes de 10 carbone. Des exemples spécifiques de tels groupements sont éthynyl, 1-propinyl, 2-propinyl, n-but-2-inyl, et 2-phényléthynyl.

Lorsque le résidu organique comporte un ou éventuellement plusieurs systèmes aromatiques il est souvent un groupement aryl comprenant de 6 à 24 atomes de carbone de préférence de 6 à 12 atomes de carbone. Des exemples 15 spécifiques de tels groupements sont phényl, 1-tolyl, 2-tolyl, 3-tolyl, xylyl, 1-naphtyl et 2-naphtyl.

Par « hétérocycle » on entend désigner en particulier un système cyclique comprenant au moins un cycle saturé ou insaturé formé de 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 atomes dont au moins un est un hétéroatome. L'hétéroatome est souvent choisi 20 parmi B, N, O, Si, P, et S. Plus souvent il est choisi parmi N, O et S.

Des exemples spécifiques de tels hétérocycles sont l'aziridine, l'azétidine, la pyrrolidine, la pipéridine, la morpholine, la 1,2,3,4-tétrahydroquinoléine, la 1,2,3,4 tétrahydroisoquinoléine, la perhydroquinoléine, la perhydroisoquinoléine, l'isoxazolidine, la pyrazoline, l'imidazoline, la thiazoline, le tétrahydrofurane, 25 le tétrahydrothiophène, le pyrane, le tétrahydropyrane et le dioxanne.

Les résidus organiques tels que définis ci avant peuvent être non substitués ou substitués par des groupements fonctionnels. Par groupement fonctionnel, on entend désigner en particulier un substituant comprenant ou constitué d'un hétéroatome. L'hétéroatome est souvent choisi parmi B, N, O, Al, Si, P, S, Sn, 30 As et Se et les halogènes. Plus souvent il est choisi parmi N, O, S et P, en particulier N, O et S.

Le groupement fonctionnel comprend généralement 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 atomes.

A titre de groupements fonctionnels on peut citer par exemple des 35 halogènes, un groupement hydroxy, un groupement alkoxy, un groupement mercapto, un groupement amino, un groupement nitro, un groupement carbonyl,

un groupement acyl, un groupement carboxyle éventuellement estérifié, un groupement carboxamide, un groupement urée un groupement uréthane et les dérivés thiolés des groupements comportant un groupement carbonyl cités ci ayant, des groupements phosphine, phosphonate ou phosphate, un groupement sulfoxyde, un groupement sulfone, un groupement sulfonate.

5 Dans le procédé selon l'invention, le substituant Z dans le composé de formule générale (I) ou (II) est souvent un groupement protecteur de la fonction amino. Dans ce cas, on obtient à titre de substrat non-réagi un dérivé de β -aminoacide énantiopur qui peut être utilisé en tant que tel comme intermédiaire 10 de synthèse peptidique.

A titre d'exemples non limitatifs de groupements protecteurs de la fonction amino pouvant être représentés par Z, on peut citer, notamment, les groupements de type alkyle ou aralkyle, substitués ou non, comme le groupement benzyle, 15 diphénylméthyle, di(méthoxyphényl)méthyle ou triphénylméthyle (trityle), les groupements de type acyle, substitués ou non, comme le groupement formyle, acétyle, trifluoroacétyle, benzoyle ou phtaloyle, les groupements de type aralkyl-oxycarbonyle, substitués ou non, comme le groupement benzyloxycarbonyle, 20 p-chlorobenzyloxycarbonyle, p-bromobenzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyl-oxycarbonyle, p-méthoxybenzyloxycarbonyle, benzhydryloxycarbonyle, 2-(p-biphénylyl)isopropyloxycarbonyle, 2-(3,5-diméthoxyphényl)isopropyl-oxycarbonyle, p-phénylazobenzyloxycarbonyle, triphénylphosphonoéthyloxycarbonyle ou 9-fluorényméthyoxy carbonyle, les groupements de type alkyloxycarbonyle, substitués ou non, comme le groupement tert-butyloxycarbonyle, 25 tert-amyoxy carbonyle, diisopropylméthyoxy carbonyle, isopropyloxycarbonyle, éthyoxy carbonyle, allyloxy carbonyle, 2-méthylsulfonyléthyoxy carbonyle ou 2,2,2-trichloroéthyoxy carbonyle, les groupements de type cycloalkyloxycarbonyle comme le groupement cyclopentyloxycarbonyle, cyclohexyloxycarbonyle, adamantyloxycarbonyle ou isobornyloxycarbonyle, les groupements comportant un hétéroatome comme le groupement benzène-sulfonyle, p-toluenesulfonyle (tosyle), mésitylènesulfonyle, méthoxytriméthylphénysulfonyle, o-nitrophénysulfonyle ou triméthylsilane.

30 Parmi ces groupements Z, ceux comprenant un groupement carbonyle sont préférés. Les groupements acyle, aralkyloxycarbonyle et alkyloxycarbonyle sont plus particulièrement préférés.

35 De préférence, le groupement protecteur est stériquement encombrant. Par « stériquement encombrant » on entend désigner en particulier un substituant

comportant au moins 3 atomes de carbone, en particulier au moins 4 atomes de carbone dont au moins un atome de carbone secondaire, tertiaire ou quaternaire. Souvent le groupement stériquement encombrant comprend au plus 100, voire 50 atomes de carbone. Un groupement protecteur choisi parmi les groupements 5 alcoxycarbonyle, aryloxycarbonyle ou aralcoxycarbonyle est préféré. Un groupement tert-butyloxycarbonyle (BOC) est tout particulièrement préféré.

Dans le procédé selon l'invention, le substituant R3 dans le composé de formule générale (I) est souvent un atome d'hydrogène. Dans ce cas, il est possible de le remplacer par des résidus organiques tels que définis plus haut, par 10 des méthodes connues en elles-mêmes.

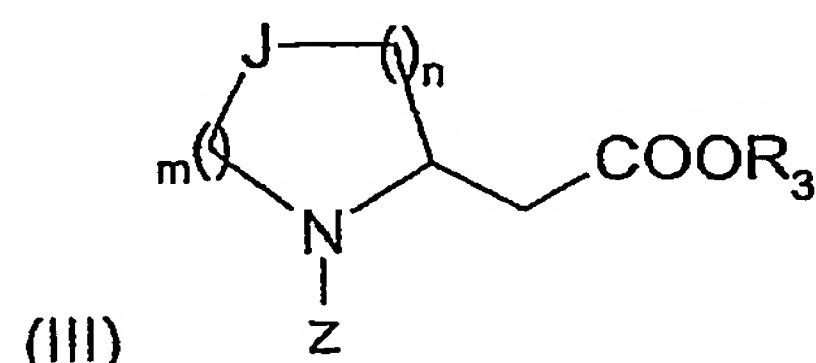
Dans le procédé selon l'invention, le substituant R4 dans le composé de formule générale (II) est souvent un groupement alkyle ou cycloalkyle tel que défini plus haut. Un groupement méthyle ou éthyle est préféré.

Dans un aspect préféré, les substituants R1 et R2 dans les composés de 15 formule générale (I) et (II) forment un hétérocycle avec le groupement NZ-CH. Ledit hétérocycle comprenant de préférence 4, 5, 6, 7 ou 8 atomes. De manière plus particulièrement préférée, il comprend 5, 6 ou 7 atomes.

Dans une variante de cet aspect, l'hétérocycle comprend au moins un 20 hétéroatome supplémentaire, choisi de préférence parmi N, O et S. Un hétérocycle comprenant au moins un hétéroatome supplémentaire, choisi parmi N et O est plus particulièrement préféré.

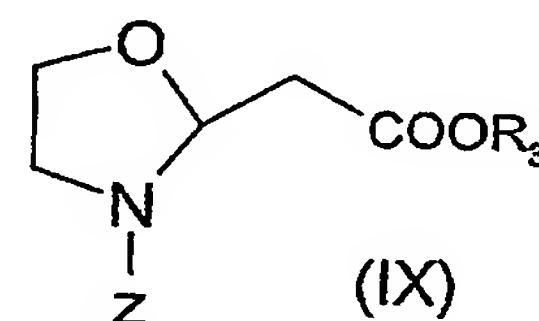
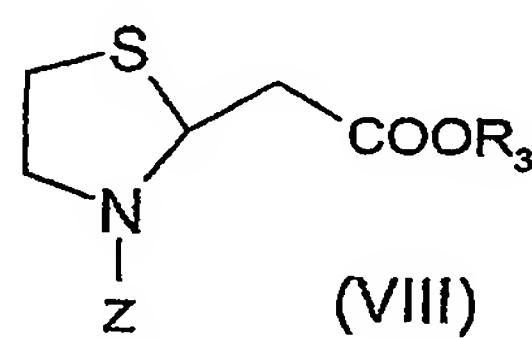
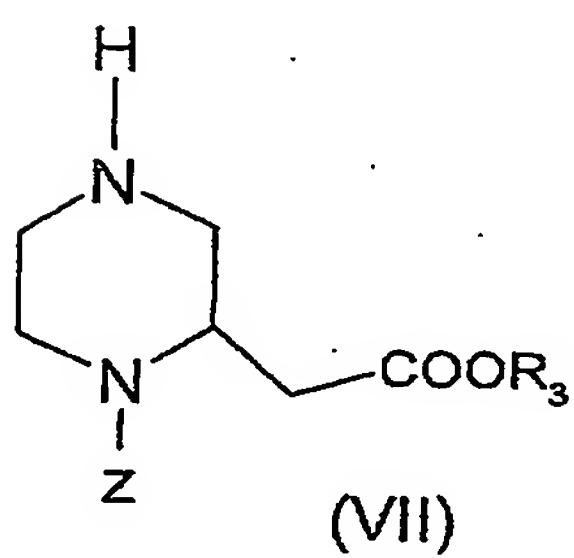
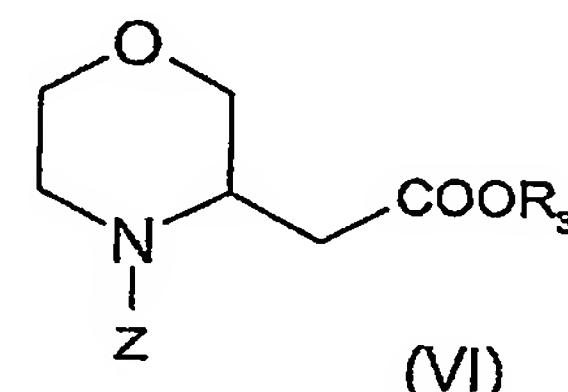
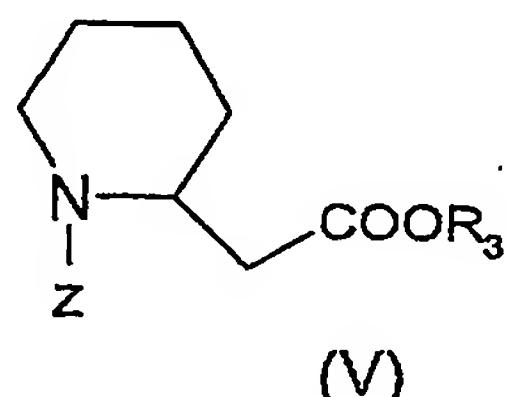
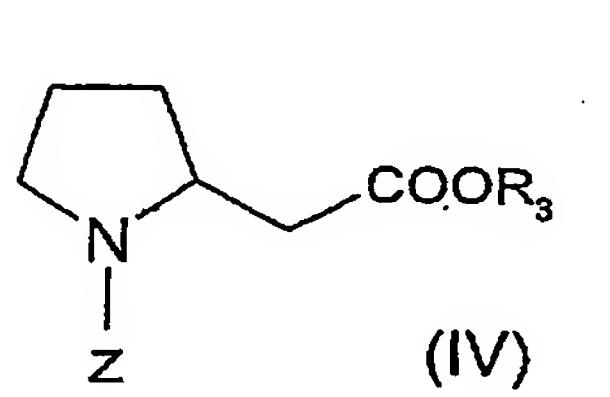
L'invention concerne aussi les β -aminoacides énantiopurs ou dérivés de β -aminoacides énantiopurs conformes à cet aspect. L'invention concerne aussi un peptide ou analogue de peptide susceptible d'être obtenu par l'utilisation dans 25 son procédé de fabrication d'un dérivé de β -aminoacide énantiopur selon l'invention. Le couplage peptique des dérivés de β -aminoacide énantiopur selon l'invention peut être réalisée selon des techniques connues en elles-mêmes.

De manière plus particulièrement préférée, le procédé selon l'invention s'applique à l'obtention d'un dérivé de β -aminoacide énantiopur de formule (III)



dans laquelle J est choisi indépendamment parmi C, N, O et S ; Z et R₄ sont tels que définis plus haut et m et n valent indépendamment de 0 à 4. De préférence m et n valent 1, 2 ou 3.

5 Des exemples spécifiques de tels dérivés de β -aminoacide énantiopur sont choisis parmi les composés ci-après



10

dans lesquels Z et R₃ sont tels que définis plus haut.

Dans le procédé selon l'invention, la lipase est souvent choisie parmi la lipase de *Pseudomonas cepacia* ou *Candida antarctica*. La lipase de *Pseudomonas cepacia* est préférée. La lipase peut être mise en œuvre sous forme libre ou 15 immobilisée, par exemple sur un support tel que de la céramique.

Dans le procédé selon l'invention, l'hydrolyse est généralement effectuée à une température supérieure ou égale à 0°C. Souvent, cette température est supérieure ou égale à 10°C. De préférence, cette température est supérieure ou égale à 20°C. Dans le procédé selon l'invention, l'hydrolyse est généralement effectuée à une température inférieure ou égale à 50°C. Souvent, cette température est inférieure ou égale à 40°C. De préférence, cette température est inférieure ou égale à 30°C. 20

Dans le procédé selon l'invention, on maintient lors de l'hydrolyse généralement un pH supérieur ou égal à 6. Souvent, le pH est supérieur ou égal à 25 6,5. De préférence, on maintient lors de l'hydrolyse un pH d'environ 7. Dans le procédé selon l'invention, on maintient lors de l'hydrolyse généralement un pH inférieur ou égal à 6. Souvent, le pH est inférieur ou égal à 7,5.

Dans le procédé selon l'invention, la quantité de lipase mise en œuvre est généralement supérieure ou égale à 10 mg/mmol de composé de formule (II). De préférence, cette quantité est supérieure ou égale à 20 mg/mmol de composé de formule (II). Dans le procédé selon l'invention, la quantité de lipase mise en œuvre est généralement inférieure ou égale à 100 mg/mmol de composé de formule (II). De préférence, cette quantité est inférieure ou égale à 50 mg/mmol de composé de formule (II).

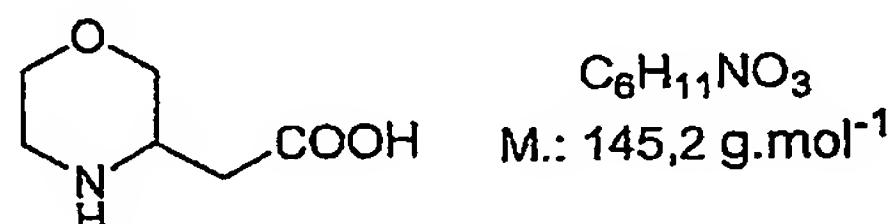
5 L'invention concerne aussi un procédé de fabrication d'un peptide ou d'un analogue de peptide selon lequel

10 (a) on produit selon le procédé de l'invention un dérivé de β -aminoacide énantiopur

(b) on utilise le dérivé de β -aminoacide énantiopur obtenu pour fabriquer le peptide ou l'analogue de peptide.

15 Les exemples ci-après entendent illustrer l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1 : Synthèse de dérivés énantiopurs de 3-Carboxyméthyl-morpholine

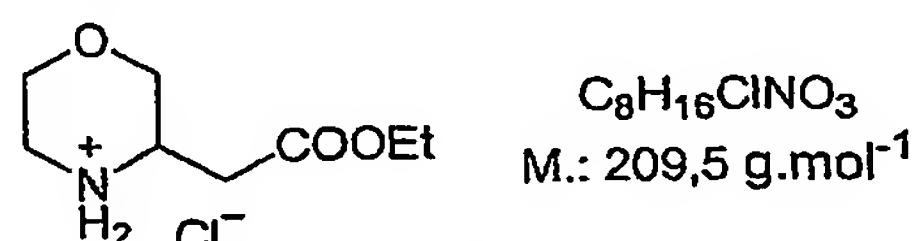


1

20

La 3-Carboxyméthyl-morpholine racémique 1 a été obtenue au départ de morpholine par des étapes successives de méthoxylation anodique (synthèse électrochimique) de morpholine N-acylée, substitution du groupement méthoxy par un groupement allylique par réaction avec l'allyltriméthylsilane en présence de TiCl_4 , suivie d'une ozonolyse oxydative.

1.1. Synthèse de chlorhydrate de la 3-carbéthoxyméthyl-morpholine



2

À 10 ml d'éthanol refroidi à 0°C, on a ajouté goutte à goutte 0,85 ml de chlorure d'acétyle. On a additionné ensuite une solution d'acide β -aminé 1 (4 mmol, 1 équiv.) dans 3 ml d'éthanol et le mélange a été mis à reflux pendant

trois heures. Après évaporation des solvants, on a isolé isole 0,83 g de produit désiré (rdt= 98%).

RMN ^{13}C :

5 δ (CDCl₃) 169,0 (s, COOEt), 67,5 (s, OCH₂CH), 63,5 (s, OCH₂CH₂), 61,6 (s, OCH₂CH₃), 51,2 (s, CHCH₂COOEt), 43,1 (s, CH₂NH), 33,1 (s, CHCH₂COOEt), 14,0 (s, OCH₂CH₃).

RMN ^1H :

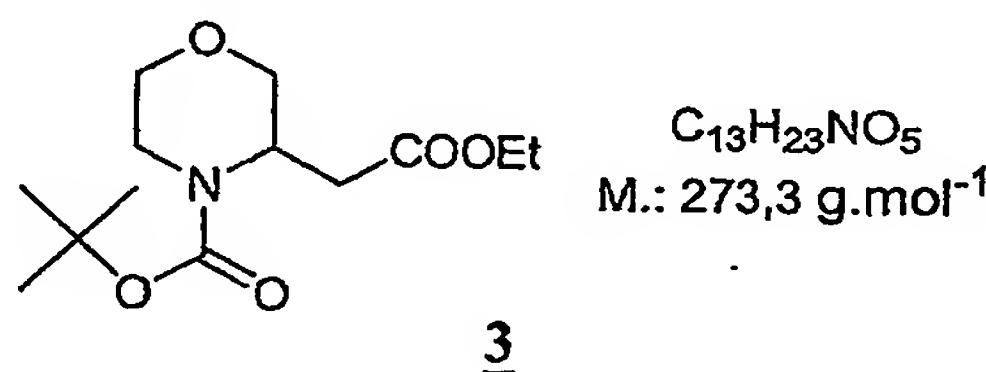
10 15 δ (CDCl₃) 4,18 (q, $^3J_{\text{H-H}}=7,2$ Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 3-84-3,15 (m, 7H, CH₂CH₂OCH₂CH), 3,11 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=4,5$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=17,1$ Hz, 1H de CH₂CO₂Et), 2,79 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=7,9$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=17,1$ Hz, 1H de CH₂CO₂Et), 1,26 (t, $^3J_{\text{H-H}}=7,2$ Hz, 3H, COOCH₂CH₃).

I.R. : (KBr) 3441 (vNH), 2954 (vNH), 1727 (vCO_{ester}).

Analyse élémentaire :

15 Calculé : C 45,83% ; H 7,69% ; N 6,68%
Mesuré : C 42,13% ; H 7,17% ; N 6,66%.

1.2. Synthèse de 4-*tert*-Butoxycarbonyl-3-carbéthoxyméthyl-morpholine



À une solution de 1,26 g d'ester β -aminé 2 (6 mmol) dans 10 ml de THF et 35 ml de dioxane on a ajouté 2g d'hydrogénocarbonate de sodium (24 mmol, 4 équiv.). Lorsque que la solution s'était homogénéisée, 1,75 g de pyrocarbonate de *tert*-butyle (8 mmol, 1,3 équiv.) a été ajouté. La solution a été chauffée pendant 5h à 40°C. Après évaporation, le résidu a été repris dans l'éther. La phase aqueuse est extraite avec 3 fois 15 ml d'éther. Les phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation des phases organiques, le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne de silice ; éluant : cyclohexane/ acétate d'éthyle 4/1. On a isolé 1,42 g d'un solide correspondant au produit attendu (rdt = 87%).

RMN ^{13}C :

δ (CDCl₃) 171,3 (s, COOEt), 154,5 (s, NCOO*t*-Bu), 80,3 (s, C(CH₂)₃), 68,9 (s, OCH₂CH), 66,9 (s, OCH₂CH₂N), 60,7 (s, OCH₂CH₃), 48,1 (s, NCH), 39,5 (s, OCH₂CH₂N), 33,8 (s, CH₂COOEt), 28,4 (s, C(CH₃)₃), 14,2 (s, OCH₂CH₃).

RMN ^1H :

5 δ (CDCl₃) 4,36 (large, 1H, NCH), 4,11 (q, $^3J_{\text{H-H}}=7,1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,840 (m, 3H, 1H de OCH₂CH₂N, 1H de OCH₂CH₂N, 1H de OCH₂CH), 3,56 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=2,8$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=11,8$ Hz, 1H, 1H de OCH₂CH), 3,43 (td, $^3J_{\text{H-H}}=2,8$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=12$ Hz, 1H, 1H de OCH₂CH₂N), 3,09 (m, 1H, 1H de OCH₂CH₂N), 2,81 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=8,8$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=15$ Hz, 1H, 1H de CH₂COOEt), 2,54 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=5,5$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=15$ Hz, 1H, 1H de CH₂COOEt), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,25 (t, $^3J_{\text{H-H}}=7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃).

10

Spectrométrie de masse :

M/Z (EI): 273 (1%) ((M)⁺), 217 (5%) ((M-C₄H₈)⁺), 200 (3%) ((M-CO₂CH₂CH₃)⁺), 172 (24%) ((M-C₅H₉O₂)⁺), 142 (43%), 130 (32%), 86 (46%), 57 (100%) ((C₄H₉)⁺), 41 (26%).

15

I.R. : (pur) 1735 (vCO_{ester}), 1698 (vCO_{carbamate}).

Analyse élémentaire :

Calculé : C 57,13% ; H 8,48% ; N 5,12%

20 Mesuré : C 57,06% ; H 8,63% ; N 5,04%.

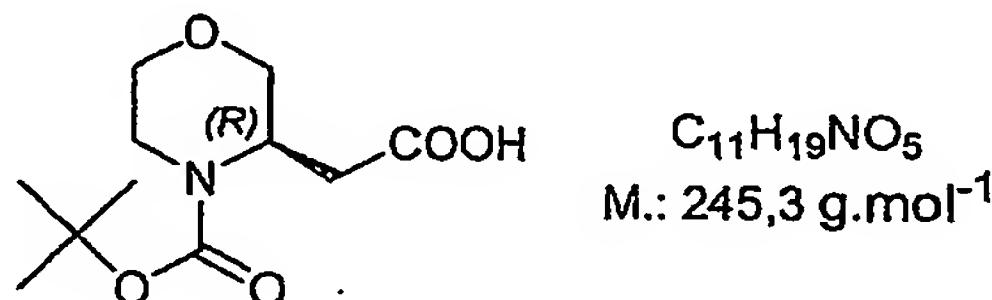
1.3. Dédoublement enzymatique de 4-*tert*-Butoxycarbonyl-3-carbéthoxyméthyl-morpholine racémique

À une solution de 273 mg de morpholine 3 (1 mmol) dans 2 ml de THF, 8ml de solution tampon pH 7 à 10⁻²M et 8 ml d'eau, on ajoute 100 mg d'enzyme 25 Amano PS (Pseudomonas cepacia). Le milieu réactionnel a été agité à 25°C et le pH a été maintenu à pH 7 à l'aide d'un auto-titreur par ajout d'une solution de soude 0,1 N. L'avancement de la réaction a été suivi par le volume de soude 0,1N ajouté. Après 10 heures d'agitation et 5 mL de soude 0,1N ajoutés, le milieu réactionnel a été centrifugé pour séparer la solution de l'enzyme. La 30 solution est concentrée puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'éther. Les phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation, on a obtenu 125 mg de 3b énantiopur (rdt= 45%). La phase aqueuse a été acidifiée jusqu'à pH 3, et a été extraite avec de l'éther. Les phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de magnésium. Après 35 évaporation, on a obtenu 120 mg de 4-*tert*-Butoxycarbonyl-3-carboxyméthyl-

morpholine énantiopur **3a** (rdt= 44%). L'acide a été recristallisé dans un mélange hexane/diisopropyléther (8/2).

(3R)-4-tert-Butoxycarbonyl-3-carboxyméthyl-morpholine 3a

5



$[\alpha]_D^{20} = -35,7$ (c= 1,94 ; CH₂Cl₂)

F : 82°C.

RMN ¹³C :

10 δ (CDCl₃) 175,9 (s, COOH), 154,5 (s, NCOOtBu), 80,5 (s, OC(CH₃)₃), 68,8 (s, OCH₂CH), 66,7 (s, OCH₂CH₂), 48,0 (s, OCH₂CH), 39,4 (s, OCH₂CH₂), 33,4 (s, CH₂COOH), 28,2 (s, OC(CH₃)₃).

RMN ¹H :

15 δ (CDCl₃) 4,34 (large, 1H, OCH₂CH), 3,91-2,95 (m, 6H, CH₂CH₂OCH₂), 2,83 (dd, ³J_{H-H}=8,5 Hz, ²J_{H-H}=15,4 Hz, 1H de CH₂CO₂H), 2,56 (dd, ³J_{H-H}=6,6 Hz, ²J_{H-H}=15,4 Hz, 1H de CH₂CO₂H), 1,47 (s, 9H, OC(CH₃)₃).

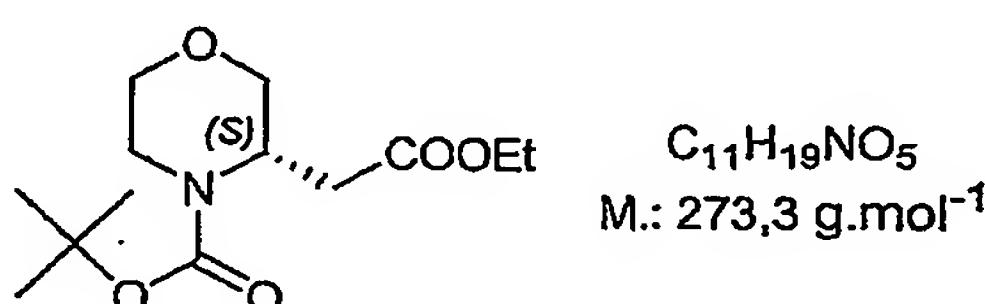
Spectrométrie de masse :

20 M/Z (EI): 245 (7%) ((M)⁺), 190 (10%), 172 (17%) ((M-OC₄H₉)⁺), 144 (3%), 172 (24%) ((M-C₅H₉O₂)⁺), 142 (43%), 130 (14%), 114 (12%), 86 (31%), 70 (12%), 57 (100%) ((C₄H₉)⁺), 41 (12%).

I.R. : (KBr) 3700-2500 (νOH_{acide}), 1713 (νCO_{acide}), 1694 (νCO_{carbamate}).

(3S)-4-tert-Butoxycarbonyl-3-carbéthoxyméthyl-morpholine 3b

25



$[\alpha]_D^{20} = +35,6$ (c = 1,15 ; CH₂Cl₂).

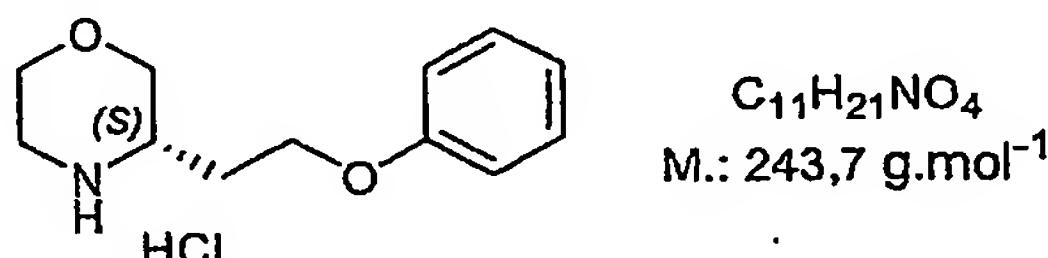
Les excès énantiomériques ont été mesurés par injection en CPG (colonne Chirasil-DEX CB) :

Débit : Hélium 1 mL/min

30 T(four) : 150°C isotherme.

tr= 13,8 min. pour le (S), 14,5 min. pour le (R).

1.4. Identification de la configuration absolue des composés 3a et 3b par synthèse du chlorhydrate de la (3S)-3-(2-Phénoxy-éthyl)-morpholine



5

À une solution de 570 mg d'ester β -aminé 3b (2,1 mmol, 1 équiv.) dans 20 ml de diéthyl éther, on a ajouté 4,2 ml de DiBAL-H (4,2 mmol, 2 équiv.) à -40°C. La solution a été agité 1h à -40°C puis 1h à température ambiante. Le mélange a été hydrolysé avec une solution d'acide chlorhydrique 0,5 N puis la solution a été extraite avec du diéthyl éther. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation des solvants, le résidu a été purifié par chromatographie sur gel de silice ; éluant : cyclohexane/ acétate d'éthyle : 2/3). On isole 390 mg d'alcool pur correspondant au produit attendu (rdt = 80%).

10 À une solution de 390 mg de cet alcool (1,7 mmol; 1 équiv.), de 160 mg de phénol (2,2 mmol, 1,3 équiv.) et de 670 mg de triphénylphosphine dans 10 ml de THF, on a ajouté 515 mg de diisopropylazodicarboxylate (2,55 mmol, 1,5 équiv.) à 0°C. Le mélange a été agité 2h30 à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec pour éluant : cyclohexane/ acétate d'éthyle : 4/1). On a isolé 290 mg d'éther pur correspondant au produit attendu (rdt = 55%). Celui-ci a été chauffé à 20 50°C pendant 12h dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'une solution d'acide chlorhydrique 3M. Après lyophilisation, on a isolé 145 mg de chlorhydrate correspondant (rdt : 63%).

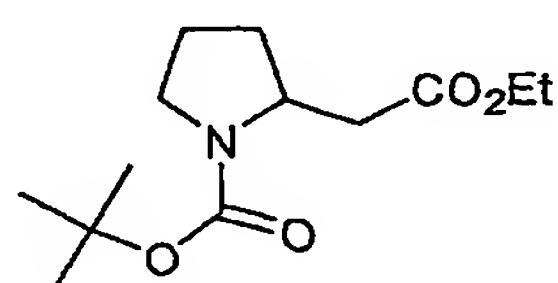
$$[\alpha]_D^{22} = -8 \text{ (c=1,8 ; H}_2\text{O)}$$

25 (litt. Brown, G. R. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1987, 547-551.)

$$[\alpha]_D^{22} = +12 \text{ (c=1,74 ; H}_2\text{O) pour le composé R.}$$

Exemple 2 : Synthèse de dérivés énantiopurs d'acide pyrrolidine-2-acétique

Dédoublement enzymatique de 4



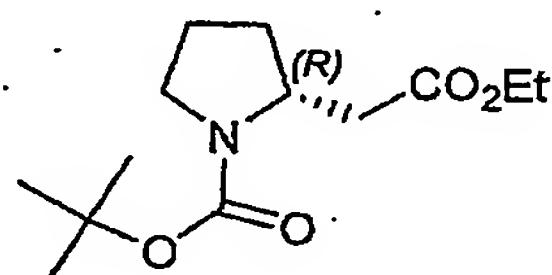
30

À une solution de 303 mg d'ester β -aminé 4 (1,18 mmol) obtenu au départ de pyrrolidine en suivant les procédures de l'exemple 1, dans 6 ml d'eau, 6 ml de

tampon pH 7 (10^{-2} M) et 2 ml de THF, on a ajouté 225 mg de lipase PS Amano. Le pH a été maintenu à 7 à l'aide d'un autotitreur par ajout d'une solution de soude 0,1 N. Après l'ajout de 6 ml de soude 0,1 N et 48 h d'agitation, la solution a été filtrée et concentrée puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'éther. Les 5 phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation, on a obtenu 144 mg d'ester **4b** (rdt : 47,5%). La phase aqueuse a été acidifiée jusqu'à pH 3, et extraite avec de l'éther. Les phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation, on a obtenu 125 mg d'acide 1-*tert*-Butoxycarbonyl-pyrrolidine-2-acétique **4a** (rdt : 46,5%).

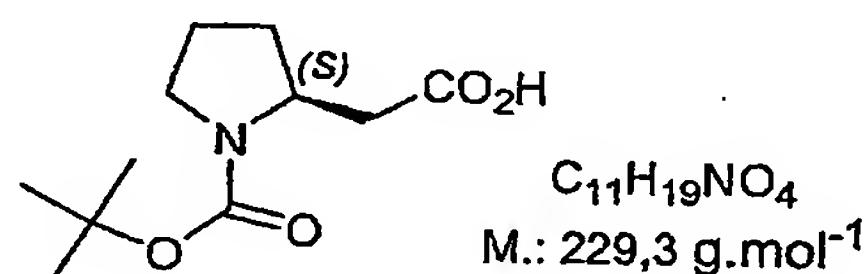
10 L'acide a été recristallisé dans l'hexane.

(2R)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-2-carbéthoxyméthyl-pyrrolidine (4b)



15 $[\alpha]_D^{20} = +40,6$ ($c = 2,50$; CH_2Cl_2) litt.¹ $[\alpha]_D^{20} = +44,1$ ($c = 2,01$; MeOH)

(2S)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-2-carbóxyméthyl-pyrrolidine (4a)



20 $[\alpha]_D^{20} = -38,6$ ($c = 1,41$; DMF) litt.² $[\alpha]_D^{20} = -39,5$ ($c = 1,9$; DMF)
 $\underline{F} = 98^\circ\text{C}$ litt.¹ : $\underline{F} = 99-101^\circ\text{C}$

RMN ¹³C :

25 δ (CDCl_3) : 177,0 (s, COOH), 156,0 (s, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 79,9 (s, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 53,9 (s, CHN), 46,3 (s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ou CH_2N), 39,1 (s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ou CH_2N), 31,2 (s, CH_2CH), 28,4 (s, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 23,5 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

RMN ¹H :

30 δ (CDCl_3) 4,34 (s large, 1H, CH_2CH), 3,30 (m, 2H, CH_2N), 2,80 (m, 1H de $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2,28 (dd, $^3J_{\text{H-H}}=10$ Hz, $^2J_{\text{H-H}}=16$ Hz, 1H de $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2,00-1,76 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1,39 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$).

¹ Cassal, J., M. ; Fürst, A. ; Meier, W. *Helv. Chim. Acta* 1976, 59, 1917-1924.

² Cassal, J., M. ; Fürst, A. ; Meier, W. *Helv. Chim. Acta* 1976, 59, 1917-1924.

Spectrométrie de masse :

M/Z (EI): 229 (5%) ($(M)^+$), 173 (24%) ($(M-C_4H_8)^+$), 156 (26%) ($(M-OC_4H_9)^+$),
128 (12%) ($(M-CO_2C_4H_9)^+$), 114 (29%), 101 (3%), 82 (3%), 70 (97%), 57
(100%) ($(C_4H_9)^+$), 41 (20%).

5 I.R. : (KBr) 3700-2800 (νOH_{acide}), 1735 (νCO_{acide}), 1655 ($\nu CO_{carbamate}$).

Les excès énantiomériques ont été mesurés sur l'ester éthylique par injection en CPG (colonne Chirasil-DEX CB) :

Débit Hélium 1 mL/min

T(four) : 150°C isotherme.

10 t_r = 9,8 min. pour le (*R*), 10,1 min. pour le (*S*).

Exemple 3 : Synthèse de dérivés énantiopurs d'acide pyrrolidine-2-acétique

Par les procédures de l'exemple 1 on a accédé à l'acide pyrrolidine-2-acétique **4a** et au méthylester correspondant **4c** énantiopurs.

Le tableau ci-après compile les excès énantiomériques obtenus

| Exemple | Produit | ee produit (%) | Substrat | ee substrat (%) |
|---------|---------|----------------|----------|-----------------|
| 1 | 3a | >99 | 3b | >99 |
| 2 | 4a | 94 | 4b | 99 |
| 3 | 4a | 99,1 | 4c | 99,4 |

RE VENDICATIONS

1 - Procédé pour la fabrication de dérivés de β -aminoacides énantiopurs répondant à la formule générale (I)

R₁-NZ-CHR₂-CH₂-COOR₃ (I)

5 dans laquelle

R₁ et R₂ désignent indépendamment des résidus organiques formant éventuellement un substituant cyclique;

R₃ désigne H ou un résidu organique et ;

Z représente H ou un groupement protecteur de la fonction amino,

10 comprenant une étape dans laquelle on soumet un mélange d'énantiomères d'un composé répondant à la formule générale (II)

R₁-NZ-CHR₂-CH₂-COOR₄ (II)

dans laquelle

R₁, R₂ et Z sont tels que définis pour la formule (I) et ;

15 R₄ est un résidu organique

à une hydrolyse en présence d'une lipase.

2 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel les substituants R₁ et R₂ dans les composés de formule générale (I) et (II) forment un hétérocycle avec le groupement N-Z-CH, ledit cycle comprenant de préférence de 4 à 8 atomes, plus 20 particulièrement de 5 à 7 atomes.

3 - Procédé selon la revendication 2, dans lequel l'hétérocycle comprend au moins un hétéroatome supplémentaire choisi de préférence parmi N, O et S.

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel le substituant Z dans le composé de formule générale (II) est un groupement 25 protecteur de la fonction amino, en particulier un groupement alcoxycarbonyle, un groupement aryloxycarbonyle ou aralcoxycarbonyle.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel le substituant R₄ dans le composé de formule générale (II) est un groupement méthyle ou éthyle.

30 6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel la lipase est la lipase de *Pseudomonas cepacia*.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans lequel l'hydrolyse est effectuée à une température de 0 à 50 °C et un pH de 6 à 8.

8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel quantité de lipase mise en œuvre est de 10 à 100 mg/mmol de composé de 5 formule (II).

9 - Procédé de fabrication d'un peptide ou d'un analogue de peptide selon lequel

(a) on produit selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 8 un dérivé de β -aminoacide énantiopur

10 (b) on utilise le dérivé de β -aminoacide énantiopur obtenu pour fabriquer le peptide ou l'analogue de peptide.

10 - Dérivé de β -aminoacide énantiopur répondant à la formule générale (I)
R1-NZ-CHR2-CH₂-COOR3 (I)

dans laquelle les substituants R1 et R2 forment un hétérocycle avec le

15 groupement N-Z-CH, ledit hétérocycle comprenant au moins un hétéroatome supplémentaire ;

R3 désigne H ou un résidu organique et ;

Z représente H ou un groupement protecteur de la fonction amino.

11 - Dérivé de β -aminoacide énantiopur selon la revendication 10, dans lequel l'hétérocycle comprend de 5 à 7 atomes et l'hétéroatome supplémentaire est choisi parmi N, O et S.

12 - Peptide ou analogue de peptide susceptible d'être obtenu par l'utilisation dans son procédé de fabrication d'un dérivé de β -aminoacide énantiopur selon la revendication 10 ou 11.

PCT/EP2004/003688

